

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
Keemia Instituut
Bioorgaanilise keemia õppetool

TÕNIS LAASFELD

AUTOMATISEERITUD MEETODI ARENDAMINE
BAKULOVIIIRUSTE KVANTIFITSEERIMISEKS

Bakalaureusetöö keemias 12 EAP

Juhendaja: teadur Sergei Kopantšuk, PhD

Tartu 2016

Sisukord

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
Bakuloviiruse ekspressioonivекtori süsteem	7
Sf9 rakud.....	8
BacMam tehnoloogia	8
Viiruste kvantifitseerimismeetodid	9
Viiruslaigumeetod	9
Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon	10
Transmissioonelektronmikroskoopia.....	11
Raku suuruse muutusel põhinev meetod	11
Optiline mikroskoopia.....	12
Läbiva valguse mikroskoopia.....	13
Digitaalne pilditöötlus ja –analüüs	13
Masinnägemine biokeemias ja molekulaarbioloogias.....	14
Maksimaalselt stabiilsete ekstreemumpiirkondade algoritm rakutuvastuseks	14
Aktiivsete kontuuride meetod rakutuvastuseks	15
Läbiva valguse mikroskoobi piltide analüüsiga kaasnevad probleemid ja eelised	16
EKSPERIMENTAALNE OSA	17
Kasutatud aparatuur, materjalid ja tarkvara	17
Sf9 rakuliini kasvatamine.....	18
Raku diameetri muutusel põhinevate tiitrimisplaatide ettevalmistus.....	18
Viiruse tiitrimine Coulteri loenduriga	18
Pildistamisprotseduur viiruse kvantifitseerimiseks	19

Pildistamisprotseduur nakatumisprotsessi jälgimiseks	19
Piltide analüüs isetehtud tarkvaraga Aparecium	19
Andmete regressioonanalüüs.....	20
Viiruslaigu meetodil viiruse kvantifitseerimise katsed	21
TULEMUSED	22
Mikroskoopia parameetrite optimeerimine	22
Objektiivi valimine	22
Pildistamisasukoha optimeerimine	22
Piltide arvu optimeerimine	24
Pilditöötlusprogrammi üldine tööpõhimõte	24
Pilditöötlusalgoritmi modifitseerimine ning kvaliteediparameetrite hindamine	26
ICSE Meetodi valideerimine.....	27
Raku diameetri suurenemiste võrdlus ICSE meetodi ja CPCSE meetodi vahel	29
Mõõdetavate parameetrite muutumine ajas.....	30
ICSE meetodi kvaliteediparameetrite määramine.....	32
TULEMUSTE ARUTELU	33
Kokkuvõte.....	35
Summary	36
KASUTATUD KIRJANDUS.....	37
Infoleht.....	40

KASUTATUD LÜHENDID

AcMNPV – *Autographa californica* multikapsiidne nukleopolühedroviirus

BacMam – Geeni ülekanne imetajarakkudesse bakuloviiruse abil (*Baculovirus gene transfer into Mammalian cells*)

BEVS – Bakuloviiruse ekspressioonivektori süsteem (*Baculovirus expression vector system*)

bp – aluspaar (*base pair*)

cAMP – tsükliline adenosiinmonofosfaat (*cyclic adenosine monophosphate*)

CCD – laengsidestusseadis (*Charge Coupled Device*)

CLSM – skaneeriv konfokaalmikroskoopia (*confocal laser scanning microscopy*)

CMOS – komplementaarne metall-oksiid pooljuht (*Complementary Metal-oxide-Semiconductor*)

CPCSE – Coulteri printsiibil põhinev raku suuruse hindamine (*Coulter Principle-based cell size estimation*)

D₁R – dopamiini D₁ retseptor

DNA – desoksüribonukleinhape

Epac – cAMP efektorvalk (*Exchange protein directly activated by cAMP*)

ICSE – pildianalüüsil põhinev raku suuruse hindamine (*Image-based cell size estimation*)

ivp – nakatusvõimeline viirusosake (*infectious viral particle*)

LED – valgusdiodlamp (*light-emitting diode*)

MC₄R – melanokortiini MC₄ retseptor

MIDAS formaat – vähima vajaliku informatsiooni formaat süsteemibioloogia andmete analüüsiks (*Minimum Information for Data Analysis in Systems Biology format*)

MOI – nakatuskordsus (*multiplicity of infection*)

MSER – maksimaalselt stabiilne ekstreemumpiirkond (*maximally stable extremal region*)

NIR – lähi-infrapuna (*near-infrared*)

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

pfu – viiruslaiku moodustav viirusosake (*plaque forming unit*)

qPCR – kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (*quantitative polymerase chain reaction*)

RFP – punane fluorestseeruv valk (*Red Fluorescent Protein*)

Sf – *Spodoptera frugiperda*

STED – stimuleeritud emissiooni kustumisel põhinev nanoskoop (*stimulated emission depletion microscope*)

TEM – transmissioonelektronmikroskoopia (*Transmission electron microscopy*)

TIRFM – täieliku sisepeegelduse fluorestsentsmikroskoopia (*Total internal reflection fluorescence microscopy*)

UV – ultraviolett (*ultraviolet*)

SISSEJUHATUS

Modernses biokeemias kasutatakse katsetes väga tihti keerulisi valgumolekule mitmel eesmärgil nagu näiteks valgu kristallstruktuuri määramiseks, ensüümkineetika või retseptorite uurimiseks, kuid valgud võivad kuuluda ka ravimite koosseisu. Suurte valkude tootmine orgaanilise sünteesi meetodil on aga võrdlemisi keeruline kui mitte võimatu, eriti kui soovitava valgu struktuuris peavad peale aminohapete olema ka posttranslatoorse modifikatsiooni käigus lisatud rühmad nagu näiteks fosforüül- või polüsahhariidrühmad. Sellised keemilised reaktsioonid toimuvad rakkude organelides ensüümide mõjul aga vägagi kõrge saagisega. Seetõttu kasutataksegi taoliste valkude tootmiseks süsteeme, kus vastavat valku kodeeriv DNA viiakse rakkudesse, mis asuvad soovitatavat valku tootma.

Üks efektiivsemaid meetodeid võõr-DNA rakku viimiseks on bakuloviiruse ekspressioonivektori süsteem ehk BEVS. BEVSis kasutatavad bakuloviirused on viirused, mis nakatavad putukarakke. Väga oluline etapp valkude tootmisel BEVS meetodiga on optimaalse viiruse ja rakkude suhte ehk MOI kasutamine, mille korral toimub protsess kõige efektiivsemalt. MOI määramiseks on vaja teada nii rakkude kui ka viiruste hulka. Kui rakke saab loendada näiteks hemotsütoomeetriga või Coulteri loenduriga, siis viiruste koguse otsene määramine on oluliselt keerulisem. Esiteks on viirused liialt väikesed, et need tavalise valgusmikroskoobiga nähtavad oleks, samuti ei suuda tavalised Coulteri loendurid neid väikse suuruse tõttu tuvastada. Lisaks on oluline, et loetaks kokku ainult need viirusosakesed, mis on ka nakatusvõimelised ning ei ole kuidagi inaktiveerunud.

Käesolevas töö eesmärgiks oli välja töötada automatiseeritud meetod bakuloviiruste kvantifitseerimiseks, see meetod valideerida ning automatiseerimiseks arendada graafilise kasutajaliidesega pilditöötlusprogramm. Arendatav meetod põhineb bakuloviiruste toimel Sf9 rakuliini rakkudele: nakatumise tulemusel hakkab raku diameeter suurenema. Rakke nakatatakse erinevate viiruse algsuspensiooni lahjendustega ning rakkude diameeter tuvastatakse pilditöötlusalgoritmiga mikroskoobiga tehtud piltidelt. Selle järgi, kuidas diameeter lahjendustegurist sõltub, arvutatakse viiruse kontsentratsioon nakatamist kirjeldavate mudelite abil.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Bakuloviiruse ekspressioonivektori süsteem

Bakuloviiruse ekspressioonivektori süsteemi ehk BEVSi kasutatakse tänapäeval laialdaselt biotehnoloogias suuremahuliseks valkude tootmiseks nii teaduses kui ka tööstuses. Peamine kasutatav bakuloviiruse tüüp on *Autographa californica* multikapsiidne nukleopolühedroviirus ehk AcMNPV. Geeni ekspressioonisüsteemide üldiseks eeliseks on suhteline odavus ning võime toota küllaltki vähese vaevaga keerulisi valke, mille tootmine orgaanilise sünteesi meetodil oleks küllaltki vaearikas ja kulgeks madala saagisega või osutuks hoopis võimatuks. BEVSi puudusteks võrreldes imerajarakkudel põhinevate süsteemidega võib pidada seda, et Sf9 rakud ei vii mõningate valkudega posttranslatoorseid modifikatsioone nagu glükosüleerimine ja fosforüleerimine läbi täpselt nii nagu sooviksime, kuid ka selle probleemi lahendamisega tegeletakse aktiivselt (Kost *et al.* 2005). BEVS süsteemi kasuks räägib aga kõrgem saagis. Võrreldes bakterite või pärmseentega, mille pooldumisaega võib mõõta minutites või tundides, jagunevad putukarakud, mille pooldumisaeg on pikem kui üks päev, kordades aeglasemalt. See tähendab, et suure koguse valgu tootmine, mille jaoks on vaja ka palju rakke, võib BEVS süsteemi korral võtta kauem aega. Samas on putukarakkudes toodetavad valgud õige tertsiaarstruktuuriga samas kui pärmides ja bakterites toodetud valgud võivad olla voltunud valesti, lisaks suudavad putukarakud viia valkudega läbi keerulisemaid posttranslatoorseid modifikatsioone kui bakterid. (Meade 1999)

BEVS süsteemis kasutatavate bakuloviiruste geneetilise info kandjaks on DNA ning nende looduslikud peremeesorganismid on näiteks liblikalised, kiletiivalised ja kahetiivalised (Wood *et al.* 1991). Bakuloviiruste DNA on võrreldes teiste viiruste omaga võrdlemisi suur, 80 – 180 kbp, mis lubab BEVSi abil ekspresseerida ka küllaltki suuri valke. On avastatud, et bakuloviirused sisenevad rakkudesse läbi endotsütootilise raja ning transkriptsioon, DNA replikatsioon ja nukleokapsiidi kokkupanek toimub nakatunud peremeesraku rakutuumas (Hefferon *et al.* 1999).

Bakuloviiruse nakatumisprotsessi käigus ekspresseerib rakk lisaks enda geenidele ka viiruse geene. Eriliselt palju ekspresseeritakse üle aga ainult teatud kindlatele promootoritele – spetsiifilistele DNA järjestusele, millelt alustatakse transkriptsiooni, järgnevad geenid. Kõige

tüüpilisemalt kasutatakse BEVSis polühedriini promootorit, millele järgneb muundamata bakuloviirustes polühedriini kodeeriv geen. Sellist geenide üleekspresseerimist kasutatakse BEVS süsteemis ära. Bakuloviiruse genoomi muudetakse nõnda, et eemaldatakse polühedriini kodeeriv geen ning selle asemele viiakse sellist valku kodeeriv geen, mida soovitakse toota. Saadud modifitseeritud plasmiid viiakse transfektsioonireagentide abil rakkudesse, kus seejärel toimub viiruste DNA replikatsioon ning bakuloviiruste tootmine (Jarvis 2009). Paralleelselt viirusosakestega toodetakse ka soovitud valke.

BEVSi rakendatakse näiteks nii valkude suuremahuliseks tootmiseks nende kristallstruktuuri määramiseks kui ka vaktsiinide tootmiseks. Tuntumatest saavutustest võib välja tuua klassikalise seakatku, inimese papilloomviiruse, eesnäärmevähi ja gripi vastased vaktsiinid (Cox 2012, Felberbaum 2015).

Sf9 rakud

Sf9 rakud on rakuliin, mis on isolaat rakuliinist Sf21 (Summers and Smith 1987). Sf21 rakuliin on omakorda aretatud liigi *Spodoptera frugiperda* munasarja rakkudest (Vaughn *et al.* 1977). Sf9 rakuliini kasutatakse laialdaselt bakuloviiruste ekspressioonisüsteemis, kuna nad on bakuloviiruse nakkusele väga vastuvõtlikud ning suudavad toota polühedriini promootorile järgnevatele geenidele vastavaid valke suurtes kogustes. Sf9 rakud võivad kasvada nii pinnale kinnitunult kui ka suspensioonina. Suspensioonina kasvatades on võimalik reaktorites kasvatada korraga suuri rakukoguseid, mis tähendab omakorda suuri valgukoguseid. Ainult pindadel kasvavate rakkudega see nii kerge ei ole.

BacMam tehnoloogia

BacMam tehnoloogia kasutab rakkudesse võõr-DNA viimiseks geneetiliselt muundatud bakuloviiruseid. BacMam süsteemi puhul toodetakse bakuloviirused endiselt putukarakukultuuris, kuid erinevus BEVSiga võrreldes seisneb selles, et valke hakkavad tootma putukarakkude asemel hoopis bakuloviirustega nakatunud imetajarakud. Samuti tuleb BacMam tehnoloogia puhul kasutada teisi promootoreid võrreldes BEVSis kasutuses olevatega, kuna imetajarakud ei ekspresseeri geene, mis näiteks polühedriini promootorile järgnevad. (Boyce *et al.* 1996)

BacMam tehnoloogia heaks küljeks võib pidada bioohutust, kuna bakuloviirused ei ole võimelised imetajarakkudes paljunema, sest imetajarakkudes puudub selleks vastav ensümaatiline aparatuur. Alternatiividena kasutatavad adeno-, retro- ja lentiviirustel põhinevad süsteemid ei ole nakkusohtlikuse tõttu niivõrd ohutud (Kost *et al.* 2002, 2010).

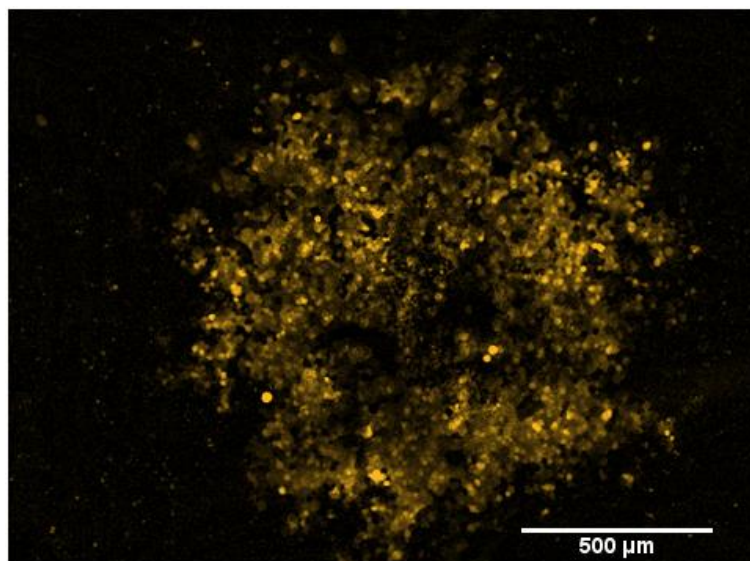
Viiruste kvantifitseerimismeetodid

Viiruste kvantifitseerimiseks on loodud palju erinevaid meetodeid, mis põhinevad kas viiruste poolt põhjustatud füsioloogilistel efektidel rakkudele, viiruste DNA analüüsil või viirusosakeste otsesel loendamisel. Järgnevalt on välja toodud mõningad kasutatavatest meetoditest.

Viiruslaigumeetod

Viiruslaigumeetodi korral nakatatakse rakkude monokihti viirusega, millega on läbi viidud seerialahjendused nõnda, et ühes süvendis oleks loetavad ligikaudu 5 – 100 viirusosakest. Rakud kaetakse kas agarosgeeli, metüülselluloosi või karboksümetüülselluloosiga, mis aitab vältida viirusosakeste Browni liikumist rakuplaadi süvendis ning ühtlasi hoiab neid elus, sest geel ei lase rakkudel ära kuivada. Viiruslaigus on surnud rakud ümbritsetud elusate rakkudega, mis on omavahel visuaalselt kontrastsed. Viiruslaikude tekkimiseks kuluv aeg, sõltub nii viiruse kui ka rakkude tüübist. (Baer *et al.* 2014)

Kvantifitseerimiseks loetakse kokku viiruslaikude hulk süvendis ning korrutatakse saadud arv kasutatud lahjendusteguriga. Bakuloviiruste kvantifitseerimisel tuleb viiruslaikude kokkulugemiseks oodata 6 – 10 päeva. Kuna rakud lüüsuvad nakkuse toimetel, siis hajutavad tekkinud viiruslaigud valgust elus rakkudest erinevalt ja seega on viiruslaigud vastu valgust vaadates kergesti palja silmaga eristatavad ja värvimine ei ole vajalik. Mikroskoobiga on võimalik näha ka viiruslaigu struktuuri, mis on toodud joonisel 1.



Joonis 1. Fluorestsentsmikroskoobiga Cytation5 (BioTek) pildistatud üksik viiruslaik läbi RFP filtri, mis lubab valgust läbi lainepikkustel $\lambda=593\pm23\text{nm}$. Pildilt on maha lahutatud taust, seejärel suurendatud kontrasti. Oranž toon on pseudovärv, mis vastab ligilähedaselt valguse lainepikkusele, mis RFP filtrit läbib. Rakkudele ei ole lisatud fluorestsentsvärvi vaid tegemist on autofluorestsentsiga. Fluorestseeruvad ainult surnud rakud, neid ümbritsevad elusad rakud pildil näha ei ole.

Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon

Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsiooni ehk qPCR meetod viiruste tiitrimiseks põhineb bakuloviiruse DNA ekstraheerimisel ja puhastamisel ning seejärel kvantitatiivsel DNA kontsentratsiooni määramisel. (Hitchman *et al.* 2007)

qPCRi esimese etapina ekstraheeritakse viirusosakestest DNA kasutades kandja-RNAga rikastatud sidumispuhvrit ning proteinaas Kd. Seejärel filtreeritakse, pestakse ja tsentrifuugitakse DNA lahust, mis pärast neid etappe on piisavalt puhas qPCR analüüsi läbiviimiseks. DNA kvantifitseerimiseks kasutatakse fluorofooriga ning kustutajaga oligonukleotiidi järjestusi ehk sonde. Kuna sondis on fluorofoor kustutaja (*ingl. k. quencher*) vahetus läheduses, siis vabas sondis fluorestsentskiirgust tekkida ei saa. Kui PCR käigus tekib sellele oligonukleotiidile vastav komplementaarset piirkonda sisaldav DNA üksikahel, siis vastav sond ja DNA molekul seostuvad ehk nende vahele tekivad vesiniksidemed. Seejärel sünteesitakse DNA üksikahelale kõrvale komplementaarne DNA ahel. Seda protsessi katalüüsib Taq polümeraas, mis reaktsiooni käigus

hüdrolüüsib sondi nii, et ahela 5' otsast eraldub fluorofoor, mille tulemusena ei ole fluorofoor ning kustutaja enam üksteise vahetus läheduses ning fluorofoor on võimeline andma fluorestsentssignaali. Seega on tekkinud fluorofoori fluorestsentsintensiivsus lineaarselt seotud tekkinud DNA hulgaga, mis on omakorda seotud bakuloviiruste esialgse kogusega. (Hitchman *et al.* 2007)

qPCRi hea omadus on selle meetodi kiirus, kogu protseduur võtab aega kuni kolm tundi. Negatiivsete külgede poolest võib välja tuua selle, et selle teostamiseks on vajalik spetsiaalse ja kalli qPCR aparatuuri olemasolu. Lisaks ei saa kindel olla, kas viirusosakestest DNA ekstraheerimisel saadakse kätte kogu DNA või kas DNA ekstraheeritakse ka viirusosakestest, mis ei ole nakatusvõimelised. Samuti on soovitatud qPCR analüüsi läbi viia ainult viirustega, mille vanus ei ole üle kolme kuu (Hitchman *et al.* 2007), mis oluliselt piirab vanemate viiruseproovide tiitrimist. Lisaks on kalibreerimisgraafiku koostamiseks vaja teadaoleva kontsentratsiooniga viiruseproovi, mille säilitamine nõuab kindlaid tingimusi, mis omakorda muudab meetodi ebamugavamaks (Virocyt 2013).

Transmissioonelektronmikroskoopia

Transmissioonelektronmikroskoobi ehk TEM tööpõhimõte seisneb läbi proovi liikuvate elektronide detekteerimisel digitaalse kaamera, mille tulemusel saadakse proovi kirjeldav pilt. Prooviks on antud juhul negatiivselt värvitud viiruseproov. TEM mikroskoop võimaldab kergesti saavutada resolutsiooni 0,6 nm (Oberlin 1989). Kuna bakuloviirused on pulgakujulised, diameetriga 30–60 nm ja pikkusega 250–300 nm (Kost and Kemp 2016), siis on nad elektronmikroskoobiga selgelt nähtavad ja kvantitatiivsete pildianalüüsimeetoditega tuvastatavad ja loendatavad. Samas on TEM seadmed kallid, proovi ettevalmistus võtab kaua aega ning meetod ei ole automatiseeritav.

Raku suuruse muutusel põhinev meetod

On märgatud, et Sf9 rakuliini rakud, mis on nakatunud bakuloviirustega, hakkavad paisuma ehk nende diameeter muutub suuremaks, samas kui nakatamata rakkude suurus jääb muutumatuks (Merten *et al.* 1998). Rakud lõpetavad bakuloviirusega nakatumisel jagunemise ning

24 tundi pärast esmast nakatumist võib täheldada, et nakatunud rakkude diameeter on suurenenud 20–40% (Janakiraman *et al.* 2006, Palomares *et al.* 2001). Selle nähtuse põhjal on viiruste kvantifitseerimiseks välja mõeldud ka eraldi meetod (Janakiraman *et al.* 2006). Selle meetodi korral nakatati Sf9 rakke viiruse suspensioonist valmistatud seerjalahjendustega ning kasutati 24 tundi hiljem rakkude loendamiseks ja nende suuruse mõõtmiseks rakuloendurit. Viiruse tiitrit hinnati momentide meetodit kasutades, mis on sarnane mitmeparameetrilisele logistilise regressiooni mudelile. Seda meetodit kirjeldab valem

$$p_{ij} = \frac{\hat{Y}_{ij} - \hat{\mu}_0}{\hat{\mu}_1 - \hat{\mu}_0} \quad (1)$$

kus i näitab lahjendusfaktori indeksit, j näitab lahjendusfaktoriga i nakatatud korduse indeksit, p_{ij} on vastavate i ja j väärtuse korral viirusega nakatunud rakkude osakaal murruna, \hat{Y}_{ij} on rakkude keskmine diameeter vastavate i ja j väärtuse korral, $\hat{\mu}_0$ on nakatamata rakkude keskmine diameeter ning $\hat{\mu}_1$ on lahjendamata viiruse suspensiooniga nakatatud rakkude diameeter. Viiruse kvantifitseerimiseks kasutati valemit

$$C = N_{ij} * p_{ij} \quad (2)$$

kus C on viiruse tiiter ühikutes ivp/ml, N_{ij} on rakkude arv terves rakukolvis, kus proov indeksitega i ja j võeti ning p_{ij} on vastavate i ja j väärtuse korral viirusega nakatunud rakkude osakaal murruna. Meetodi ajakuluks hinnati kuni 1,5 tundi algsete lahuste valmistamiseks, 24 tundi rakkude paisumisprotsessi kulgemiseks, 1 tund diameetrite mõõtmiseks ning 1 tund andmete analüüsiks. (Janakiraman *et al.* 2006)

Optiline mikroskoopia

Optiline mikroskoopia on mikroskoopia meetoditest vanim. Termin mikroskoop võeti kasutusele juba aastal 1625. Tänapäevased mikroskoobid ei kasuta enam detektorina vahetult inimese silma vaid tüüpiliselt CCD ja CMOS kaameraid või fotoelektronkordisteid, valgusallikatenä kasutatakse LED- või halogeenlampe ning lasereid. Optiline mikroskoopia on viimastel aastakümnetel teinud läbi suure arengu ning sellel on nüüdseks mitmeid alaliike. Vanim neist on läbiva valguse mikroskoopia, mida ka antud töös kasutatud on. Tuntumatest valgusmikroskoopia liikidest võib veel välja tuua skaneeriva konfokaalmikroskoopia (*ingl. k. confocal laser scanning microscopy*) ehk CLSM, täieliku sisepeegelduse

fluorestsentsmikroskoopia (*ingl. k. total internal reflection fluorescence microscopy*) ehk TIRFM, stimuleeritud emissiooni kustumisel põhinev nanoskoopia (*ingl. k. stimulated emission depletion nanoscopy*) ehk STED nanoskoopia, lähiinfrapunamikroskoopia (*ingl. k. near-infrared microscopy*) ehk NIR-mikroskoopia, ultraviolettmikroskoopia (*ingl. k. ultraviolet microscopy*) ehk UV-mikroskoopia ja faasikontrasti mikroskoopia (*ingl. k. phase-contrast microscopy*).

Läbiva valguse mikroskoopia

Läbiva valguse mikroskoopia eelisteks on aparatuuri suhteline lihtsus võrreldes teiste optilise mikroskoopia liikidega ning seetõttu on ta ka kõige laialdasemalt kasutuses (Tscherepanow *et al.* 2008) ning hinna poolest kõige odavam. Läbiva valguse mikroskoobid on tänapäeval olemas väga paljudes biokeemia ja rakubioloogia laborites ning täidavad väga erinevaid ülesandeid.

Läbiva valguse mikroskoopia põhineb valguse neeldumisel uuritavas objektis, mis jääb valgusallika ning detektori vahele. Seega paistavad uuritavad objektid tumedama kui taust ning kui need neelavad teatud lainepikkusega valgust rohkem kui valgust teistel lainepikkustel, siis on neil ka värv. Kuna paljud rakutüübid ei ole naturaalselt värvilised ning neelavad valgust vähe, mis viib madala kontrastsuseni, siis tavaliselt värvitakse proovid mõne orgaanilise värviga, mis siseneb rakkudesse või adsorbeerub rakumembraanile ning seetõttu muudab rakud tausta suhtes kontrastseks.

Digitaalne pilditöötlus ja –analüüs

Digitaalne pilditöötlus on tehnika, milles kasutatakse arvutialgoritme, et töödelda kahe või enama dimensioonilisi digitaalseid pilte. Enamasti on piltide kaheks põhiliseks dimensiooniks kaks ruumikoordinaati. Nendele võib lisanduda näiteks aeg, kolmas ruumikoordinaat, faasinihe, valguse polarisatsioon, valguse lainepikkus või selle vahemik ja fluorestsentseluiga. Võimalikud ülesanded, mida digitaalne pildianalüüs on võimeline lahendama, on näiteks klassifikatsioon, mustrite äratundmine ja objektide jälitamine (*ingl. k. object tracking*) (Klette 2014).

Masinnägemine biokeemias ja molekulaarbioloogias

Masinnägemine, mida kutsutakse ka raalnägemiseks või tehisnägemiseks, on kontseptsioon informaatikas, mille eesmärgiks on kaamerate abil tehtud piltide analüüs ja nende mõistmine. Uurimissuunad masinnägemises hõlmavad metodoloogilisi ja algoritmilisi probleeme ning algoritmide rakendamist reaalsete probleemide lahendamisel (Klette 2014). Masinägemine on küllaltki laialt kasutuses ning ilmselt on paljud kokku puutunud fotoaparaatide või nutitelefonide näo- ning naeratustuvastussüsteemidega, optilise märgituvastusega või mängijat virtuaalreaalsusesse projitseerivate seadeldistega nagu Kinect.

Biokeemias ja molekulaarbioloogias on põhilisteks huviobjektideks aga koed, rakud, rakusisesed struktuurid (organellid, mikrotuubulid jne), viirused ning viimasel ajal ka üksikud molekulid. Piltide tegemiseks kasutatakse tüüpiliselt mikroskoope. Olenevalt eesmärgist on enimlevinud mikroskoopiameetoditeks näiteks valgusmikroskoopia, fluorestsentsmikroskoopia, elektronmikroskoopia ja aatomjõumikroskoopia. Tüüpilised küsimused, millele bioloogia üritab masinnägemise abil vastuseid saada, võivad olla seotud rakkude jagunemise, suuruse ja morfoloogiaga ning nende muutumisega ainete või geenimutatsioonide mõjul. Biokeemia seisukohast võivad küsimused seotud hoopis fluorestsentsmärgistatud molekulide, näiteks valkude omavahelise interaktsiooni kineetika ja termodünaamikaga – uurimisvaldkond on tohutu. Masinnägemine on sellisele küsimustele vastamiseks hädavajalik, kuna inimesed teevad piltide analüüsimisel küll kvaliteetset tööd, kuid see tegevus on ajamahukas, arvutid aga võrdlemisi kiired. Nõuded, millele masinnägemise algoritmid peavad üldjuhul vastama on kiirus, täpsus ja võimalikult säästlik arvuti mälukasutus. Läbiva valguse mikroskoopia pilditelt rakkude tuvastamiseks on välja pakutud mitmeid erinevaid algoritme, millest kahte järgnevalt tutvustatakse.

Maksimaalselt stabiilsete ekstreemumpiirkondade algoritm rakutuvastuseks

Maksimaalselt stabiilsete ekstreemumpiirkondade ehk MSER algoritm rakkude tuvastuseks läbiva valguse mikroskoopia pildilt on välja töötatud prof F.J. Theise töörühmas (Buggenthin *et al.* 2013). Selles töös on mikroskoobi pilditelt rakkude tuvastamiseks kasutatud masinõppel ning maksimaalselt stabiilsete regioonide põhimõttel töötavat algoritmi. Kuigi rakkude tuvastamiseks on ka varem välja pakutud tarkvara, mis sobib kokku suuremahulisel

sõelumismeetodil kogutud piltide analüüsiks, ei tööta need tavaliselt kuigi hästi läbiva valguse mikroskoobiga tehtud piltide analüüsiks vaid on pigem mõeldud fluorestsentspiltidelt rakkude leidmiseks.

Buggenthin *et al.* välja töötatud meetod koosneb neljast etapist. Esimese etapina fokusseeritakse mikroskoop sobivale fookustasandile ning tehakse rakkudest pilt. Teise etapina rakendatakse masinõppel põhinevat meetodit tausta eemaldamiseks. Kolmanda etapina rakendatakse MSER algoritmi, et leida pildilt pikslid, mis kuuluvad rakkude koosseisu. Neljanda etapina eraldatakse üksteisest rakud, mis on ekslikult loetud üheks objektiks ning ühendatakse rakud, mis on ekslikult jaotatud mitmeks eraldi objektiks. Selles artiklis on jõutud peamise järelduseni, et antud meetod on täpsem, kui eelnevalt välja töötatud tarkvarad ning ka kiirem. Meetodi täpsuseks oli rakkude tuvastamisel vähemalt 82,2%, kuid käesolevas töös arendatud bakuloviiruste kvantifitseerimismeetodile kõige sarnasemate parameetrite korral 91,8%. (Buggenthin *et al.* 2013)

Aktiivsete kontuuride meetod rakutuvastuseks

Aktiivsete kontuuride meetod rakutuvastuseks on välja arendatud Bielefeldi Ülikooli rakendusliku arvutiteaduste töörühma teadlaste poolt. (Tscherepanow *et al.* 2008). Nende väljatöötatud algoritm analüüsib pilte nelja etapina. Esimese etapina rakendatakse tausta eemaldamiseks morfoloogilist operaatorit. Seejärel ennustatakse, millised pikslid esindavad kõige tõenäolisemalt rakumembraane kasutades lineaarsete struktuurielementidega morfoloogilisi operaatoreid. Järgmise etapina leitakse rakumarkerid. Rakumarkerite leidmisel maksimeeritakse markerite kaugus taustast ja membraanipikselitest. Seega asub iga rakumarker pildil lokaalses maksimumis, mis loetaksegi raku keskpäigaks. Viimase etapina leitakse rakukontuurid aktiivsete kontuuride meetodil. Selle meetodi eelisena tuuakse välja fakt, et alati saadakse suletud kontuur. Lisaks saab sellise algoritmi kasutamisel anda ette eelnevalt teadaolevaid parameetreid nagu arvatav raku diameeter ja ekstsentrilisus, mis võimalab meetodit robustsemaks muuta. Kirjeldatud meetodi täpsus võrreldes käsitsi analüüsiga oli kuni 90,1%. (Tscherepanow *et al.* 2008)

Läbiva valguse mikroskoobi piltide analüüsiga kaasnevad probleemid ja eelised

Üldiselt on rakkude analüüsil läbiva valguse meetodil mitu eelist. Esiteks on fluorestsentspiltide tegemine pika aja (päevade) vältel ja lühikese intervalliga (minutid) keeruline fototoksilisuse tõttu, seega on pikemat aega kestvate katsete puhul parem kasutada läbiva valguse mikroskoobiga tehtud pilte, et jälgida rakkude genealoogiat. Teiseks annab läbiva valguse mikroskoopia võimaluse mõõta rakke paremini kirjeldavaid omadusi nagu näiteks tekstuuri ja kuju samaaegselt. Lisaks võib fluorestsentsvärviga näiteks tsütoplasma värvimine olla ebaühtlane ja mõjutada süstemaatiliselt edasise analüüsi tulemusi (Buggenthin *et al.* 2013). Need põhjused on olulised ka käesoleva töö kontekstis, kuna mõõtmisi teostati mitme päeva vältel ning samuti on oluline just rakkude kuju täpne mõõtmine, kuna olulisim parameeter ongi tegelikult rakkude diameeter.

Läbiva valguse mikroskoopia piltide analüüsiga kaasneb ka mitmeid probleeme. Rakud, mida on pildistatud läbiva valguse mikroskoobiga, on heterogeensema intensiivsusega ja ei ole tihti taustaga võrreldes kontrastsed. Lisaks võib valgustuse ebaühtlus nii ajas kui rakukultuuri plaadi eri piirkondades tähendada seda, et selliste algoritmi parameetrite paikapanek, mis toimiksid kogu eksperimendi ulatuses, on raskendatud. Seetõttu ei saa kasutada selliseid pilditöötlustarkvararaamistikke, mis on arendatud peamiselt fluorestsentspiltide töötluks. Vaatamata suurele hulgale meetoditele, mis sellistesse pilditöötlustarkvaradesse nagu *CellProfiler* on integreeritud, ei suuda senini saadaval olevad algoritmid illuminatsiooni parandusi ja rakkude eraldamist piisavalt heal tasemel teostada, et saada paljudest suuremahulisel sõelumismeetodil tehtud piltidest rahuldavaid tulemusi (Buggenthin *et al.* 2013). Selliste probleemidega tuli kokku puutuda ka käesoleva töö tegemisel. Siiski suutis MSER algoritm nende probleemidega võrdlemisi hästi toime tulla ning saadav kasu kompenseerib läbiva valguse mikroskoopiaga kaasnevad probleemid.

EKSPERIMENTAALNE OSA

Kasutatud aparatuur, materjalid ja tarkvara

Sf9 rakuliin osteti firmalt Invirtogen, rakke kasvatati temperatuuril 27 °C ning rakke hoiti mõõtmiste käigus samuti samal temperatuuril. Rakusööde EX-CELL® 420 Serum-Free Medium for Insect Cells osteti firmalt Sigma-Aldrich. Bakuloviirused valmistati laborisiseselt, Maris-Johanna Tahk valmistas Epac-S^{H74}, Epac-S^{H134} ja Epac-S^{H188} biosensoreid kodeerivate geenidega viirused, Santa Veikšina valmistas MC₄R kodeeriva geeniga viirused ja Reet Link valmistas viiruse kvantifitseerimiseks vastava viiruse proovid ning Anni Allikalt valmistas D₁R kodeeriva geeniga viirused. Mikroskoop Cytation5 osteti firmalt Biotek. Objektiiv UPLFLN 4x (WD 17, NA 0.13) (Olympus) osteti samuti firmalt Biotek. Kasutatud 24 ja 6 süvendiga Biolite rakukasvatusplaadid osteti firmalt ThermoFisher Scientific. Coulteri loendur asus TÜ molekulaar- ja rakubioloogia instituudis, kus seda kasutati prof. A. Kristjuhani loal. Tarkvara Matlab 2009 7.8.0 (R2009 a) osteti firmalt MathWorks, tarkvara Eclipse Java Mars on vabavariiselt saadaval Eclipse Foundation kodulehelt <https://eclipse.org/>. Tarkvara Gen5, mida kasutati mikroskoobi Cytation5ga mõõtmiste tegemiseks, osteti firmalt Biotek. Andmete töötlemiseks ja analüüsiks kasutati tarkvara Aparecium, mis loodi töö käigus, ja GraphPad Prism 5, mis osteti firmalt GraphPad Software. Viiruslaigumeetodi parandite arvutamiseks kasutati programmi ImageJ, mis on vabavariiselt saadaval lehel <https://imagej.nih.gov/ij/>. Arvutused teostati kahel arvutil. Esimene arvutitest kasutas 8 GB RAM mälu ning protsessorina neljatuumalist Intel® Core™ i5-2500K CPU @ 3.30 GHz ning operatsioonisüsteemina Windows 7 Professional 64 bitist versiooni. Teine arvuti kasutas 64 GB RAM mälu ning protsessorina neljatuumalist Intel® Core™ i7-4820K CPU @ 3.70 GHz ning operatsioonisüsteemina Windows 8.1 Pro operatsioonisüsteemi 64 bitist versiooni. Viiruslaigu meetodi jaoks kasutatud agaroosgeeli valmistamiseks kasutati BioTop agaroosi firmalt Naxo OÜ. Rakkude loendamiseks ja elumuse määramiseks kasutati rakuloendurit TC10™ Automated Cell Counter firmalt Bio-Rad Laboratories, rakkude värvimiseks kasutati 0,4% trüpaansinise (Sigma-Aldrich) lahust vees.

Sf9 rakuliini kasvatamine

Sf9 rakuliini kasvatati temperatuuril 27 °C söötmes EX-CELL® 420 Serum-Free Medium for Insect Cells ning rakkude hulka ruumalaühikus hoiti seejuures vahemikus $8 \times 10^5 - 4 \times 10^6$ rakku/ml söötmes. Rakke kasvatati 250 ml rakukasvatuskolvis, mida loksutati loksutil sagedusega ligikaudu 1 Hz, et vältida rakkude agregeerumist.

Raku diameetri muutusel põhinevate tiitrimisplaatide ettevalmistus

Rakususpensioonis loendati rakud rakuloenduriga TC10™ Automated Cell Counter ning lahjendati söötmega nii, et saadi suspensioon rakkude tihedusega 8×10^5 rakku/ml. Rakususpensiooni pipeteeriti igasse 24 süvendiga rakukasvatusplaadi süvendisse 250 µl saades rakutiheduseks igas süvendis 2×10^5 rakku/süvendis. Seejärel loksutati plaati kasutades kaheksakujulist orbitaali, et rakke võimalikult ühtlaselt jaotada. Plaati hoiti 27 °C inkubaatoris 20 – 30 minutit, et rakud kinnituks plastiku pinnale. Uuritavast viiruseproovist valmistati seerialahjendused EX-CELL® 420 Serum-Free Medium for Insect Cells söötmes ning erineva lahjendusfaktoriga viiruseproove lisati süvenditesse 250 µl duplikaatides. Lõplikud lahjendusfaktorid süvendites on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Katsetes kasutatud lahjendusfaktorid

Lahjendusfaktor	2	6	18	54	162	486	1460	4380	13100	39400	118000	Tühiproov
Log(Lahjendusfaktor ⁻¹)	-0.30	-0.78	-1.26	-1.73	-2.21	-2.69	-3.16	-3.64	-4.12	-4.60	-5.07	Tühiproov

Viiruse tiitrimine Coulteri loenduriga

Coulteri loenduri mõõteparameetrid seati paika nii, et rakke loendati ainult diameetrite vahemikus 11 – 22 µm. Igas süvendis olnud rakud pesti pipetijoa abil süvendi põhjast uuesti lahti ja pipeteeriti lahusesse (0,9% NaCl ja 0,1% NaN₃ lahustatud MilliQ vees) saades rakususpensioonist 20-kordse lahjenduse. Coulteri loenduriga mõõdeti saadud suspensioonis rakkude diameeter ning hulk vahetult pärast suspensiooniks viimist. Mõõtmised teostati võimalikult täpselt 24 tundi pärast rakkude nakatamist viirusega. Ühe plaadi mõõmiseks kulus

ligikaudu 20 – 25 minutit. Edaspidi viidatakse Coulteri loenduriga tiitrimismeetodile kui CPCSE (*Coulter Principle-based cell size estimation*) meetodile.

CPCSE mõõtmise põhineb Coulteri printsiibil. Coulteri loenduris juhitakse kolloidlahus läbi kapillaari ning mõõdetakse kapillaaris oleva lahuse elektritakistus. Kui kapillaari satub kolloidosake, mis elektrit ei juhi, siis elektritakistus kasvab, mis omakorda põhjustab pinge ja voolutugevuse muutuse seniks, kuni osake on kapillaaris. Muutuse suurus on aga proportsionaalne osakese ruumalaga. Seega saab iga pinge või voolutugevuse võnkumise mõõta kui kolloidosakese detekteerimise ning võnkumise suuruse järgi mõõta tema ruumala. (Hurley 1970)

Pildistamisprotseduur viiruse kvantifitseerimiseks

Gen5 tarkvaraga valmistati uus eksperimendifail protokollifailist lähtuvalt. Selles toodud instruktsioonide põhjal pildistas Cytation5 igast süvendist neli pilti, ühe plaadi pildistamiseks kulus ligikaudu seitse minutit. Protokoll on leitav veebilehelt <http://www.ut.ee/gpcr/Aparecium/ICSE>.

Pildistamisprotseduur nakatumisprotsessi jälgimiseks

Toimiti sarnaselt pildistamisprotseduurile viiruse kvantifitseerimiseks, kuid seekord pildistas Cytation5 igast süvendit tunnise või pooletunnise intervalliga, alustades kas kohe pärast rakkude bakuloviirusega nakatamist või 20 tundi pärast nakatumist ning lõpetades 48 kuni 60 tundi pärast nakatamist. Protokoll on leitav veebilehelt <http://www.ut.ee/gpcr/Aparecium/ICSE>.

Piltide analüüs isetehtud tarkvaraga Aparecium

Pilte analüüsiti tarkvara Aparecium tööriistaga ICSE Tools, mille lähtekood ja kompileeritud programm on saadaval veebiaadressil <http://www.ut.ee/gpcr/Aparecium/>. Piltide analüüsil kasutati järgmisi parameetreid:

„Full image“, „Merge“, „Create and save Binary images“, valikute „Choose time“ ja „Average of cycle“ abil määrati pildistamise täpne aeg. Paneeli „Experiment configuration“ abil määrati ära,

millises süvendis millist viiruse lahjendust kasutati. Valiku „Automatically save MIDAS file“ abil salvestati tulemused pärast arvutuste lõppu automaatselt MIDAS formaadis. Aparecium tarkvara tööriista MIDAS Toolsi abil teostati andmetega transformatsioone nii, et neid saaks lihtsasti analüüsida mõne regressioonianalüüsi programmiga nagu näiteks Prism 5.

Andmete regressioonanalüüs

Iga katse jaoks teostati andmetega järgmised analüüsietapid:

1. Optimeeriti kolmeparameetriline logistiline funktsioon (edaspidi mudel 1) igal mõõtmistsüklil saadud rakudiametrite väärtuste järgi kasutades vähimruutude meetodit. Mudelit kirjeldab võrrand

$$D = D_0 + (D_{max} - D_0) / (1 + 10^{\log EC_{50} - \log(\frac{1}{f})}) \quad (3)$$

kus D on rakkude mõõdetud aritmeetiline keskmine diameeter, D_0 on nakatumata rakkude aritmeetiline keskmine diameeter, D_{max} on bakuloviirusega nakatunud rakkude aritmeetiline keskmine diameeter, EC_{50} vastab sellisele $1/f$ väärtusele, kus $D = \frac{D_{max} + D_0}{2}$ ning f on bakuloviiruse suspensiooni lahjendusfaktor antud katsepunktis. Viiruse kontsentratsioon c on leitav seosest

$$c = \frac{N}{EC_{50}} \quad (4)$$

kus N on rakkude arv süvendis ning EC_{50} on eeltoodud võrrandist leitud parameetri väärtus antud katse jaoks. Mudel 1 eeldab, et iga rakk saab nakatuda vaid ühe viirusosakesega.

2. Optimeeriti E.L.Ellise ja Max Delbrücki bakteriofaagi nakatumise mudeli (Ellis and Delbrück 1939) modifikatsioon (edaspidi mudel 2) igal mõõtmistsüklil saadud rakudiametrite väärtuste järgi kasutades vähimruutude meetodit. Mudelit 2 kirjeldab võrrand

$$D = D_0 + (D_{max} - D_0) * E(M, f) \quad (5)$$

kus D on antud f väärtuse korral rakkude aritmeetiline keskmine diameeter, D_0 on nakatumata rakkude aritmeetiline keskmine diameeter, D_{max} on bakuloviirusega nakatunud rakkude aritmeetiline keskmine diameeter ning $E(M, f)$ on E.L.Ellise ja Max Delbrücki mudelist tuletatud funktsioon, mis näitab, kui suur osa rakkudest on teatud viirusosakeste hulga ja rakkude hulga

suhte M ja lahjendusfaktori f korral olema nakatunud.

$$E(M, f) = 1 - \exp\left(-M * 10^{\frac{1}{f}}\right) \quad (6)$$

Mudel 2 on optimeeritavateks parameetriteks D_0 , D_{max} ning M . Proovis oleva bakuloviiruse kontsentratsioon c ühikuga ivp/ml on leitav seosest $c = M * N/V$, kus N on rakkude hulk süvendis ning V on süvendis oleva lahuse ruumala milliliitrites.

3. Normaliseeriti tiitrimisgraafikud kasutades võrrandit 1, kus $\hat{\mu}_1$ lähenduseks on võetud mudeli 1 parameeter D_{max} ja $\hat{\mu}_0$ lähenduseks mudeli 1 parameeter D_0 . Saadud nakatunud rakkude osakaal esitati protsendina.
4. Koostati sõltuvusgraafikud, kus x teljel oli mõõtmise aeg võttes nullpunktiks viirusega nakatamise hetke ning y teljel oli antud ajapunktil mõõdetud diameetri parameeter $\log(\text{ivp/ml} * \text{ml})$, mis olid määratud nii mudel 1 kui ka mudel 2 põhjal.

Viiruslaigu meetodil viiruse kvantifitseerimise katsed

Sf9 rakud loendati ning lahjendati rakususpensiooni nii, et rakkude tihedus oleks $1 * 10^6$ rakku/ml ning igasse BioLite 6 süvendiga plaadi süvendisse jaotati 1 ml suspensiooni. Selline tihedus tagab, et rakud oleks plaadile jaotunud monokihina. Rakkudel lasti põhja settida ning plastikule kinnitada 30 – 60 minuti jooksul. Bakuloviiruse proovist valmistati 10^5 -, 10^6 - ja 10^7 -kordsed lahjendused. Rakkudelt eemaldati sööde ning süvenditesse kanti vastava lahjendusfaktoriga bakuloviiruse suspensioon, iga lahjendusfaktori kohta kasutati kahte süvendit. Viirusesuspensioonil lasti rakke nakatada 1 tunni jooksul, misjärel eemaldati rakkudelt viirusesuspensioon. Agarosist valmistati 0,7% lahus söötmes EX-CELL® 420 Serum-Free Medium for Insect Cells ning hoiti enne kasutamist temperatuuril 38,5 °C. Igasse süvendisse kanti 2 ml agarosilahust ning lasti agarosgeelil 20 minutit moodustuda, seejärel suleti rakukasvatusplaat parafilmiga ning säilitati 6 – 10 päeva 27 °C inkubaatoris. Lõpuks loendati süvenditest viiruslaigud ning märgiti igas süvendis ära alad, kust ei olnud võimalik viiruslaike lugeda. Viiruslaikude hulka igas süvendis parandati parandusteguriga, mis oli võrdne terve süvendi pindala ja loetava ala pindalade suhtega. Parandustegur arvutati kasutades tarkvaat ImageJ. Igast plaadist tehti ka andmete säilitamise eesmärgil pilt Canoni digitaalse fotoaparaadiga.

TULEMUSED

Mikroskoopia parameetrite optimeerimine

Bakuloviiruste tiitrimismeetodi väljatöötamisel optimeeriti mitu parameetrit, et saavutada võimalikult suur rakkude mõõtmise täpsus. Olulisemateks parameetriteks osutusid kasutatav objektiiv, pildistamise asukoht ja ühest süvendist tehtavate piltide arv. Teisi katses kasutatud parameetreid on võimalik vaadata protokollifailidest, mis on toodud lehel <http://www.ut.ee/gpcr/Aparecium/ICSE>.

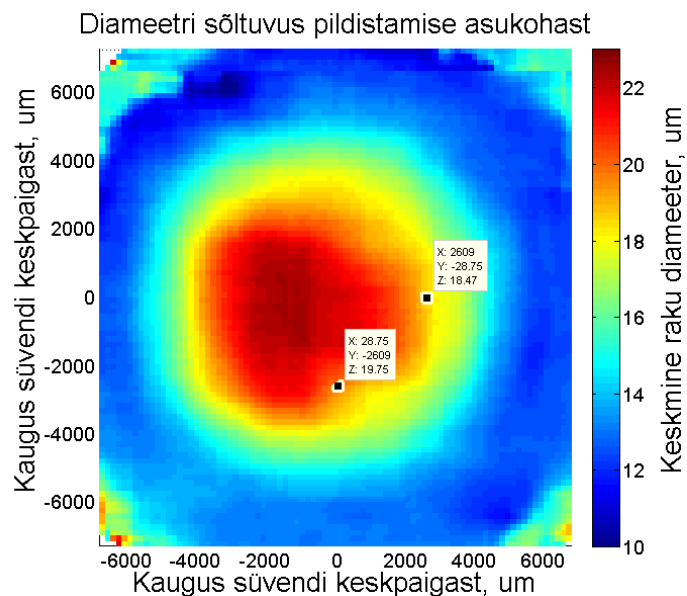
Objektiivi valimine

Objektiiviks valiti 4x suurendusega objektiiv. Sellise suurendusastmega on rakkude diameetrite kasv kergesti tuvastatav ning pildile jääb mõõtmise ajal ligikaudu 2000 – 4000 rakku. Kui kasutada 20x suurendusega objektiivi, siis oleks rakkude arv ühel pildil 25 korda väiksem ehk ainult 80 – 160 rakku. See tähendaks, et on suurem risk teha pilt kohast, kus rakke on vähe või ei oleks need esinduslikud ning sama arvu rakkude pildistamiseks tuleks teha 25 korda rohkem pilte. See tähendaks aga, et piltide tegemiseks kuluks palju kauem aega ning piltide salvestamiseks oleks vaja oluliselt rohkem mälu ja aega ning pikeneks ka arvutusteks kuluv aeg. Väiksema suurendusega objektiivi ei kasutatud, kuna selle kasutamisel oleks resolutsioon juba nii väike, et diameetri täpne mõõtmine ei ole võimalik.

Pildistamisasukoha optimeerimine

Pildistamisasukoha optimeerimiseks tehti 24 tundi pärast rakkude nakatamist igast süvendist 88 pilti, millest piisas terve süvendi jäädvustamiseks. Seejärel kasutati Aparecium tarkvara ICSE Tools tööriista, et genereerida binaarpildid. Binaarpildid liideti (*ingl. k. image stitching*) Matlab tarkvara abil kokku tervet süvendit katvateks piltideks ning seejärel analüüsiti libiseva akna (*ingl. k. sliding windows*) meetodil kogu süvendit. Sellisel meetodil sai koostada graafikud, kus x ja y teljel olid pildi tegemise asukoha ruumikoordinaadid ning z teljel oli antud asukohas mõõdetud rakudiameter, analoogse graafiku sai koostada ka raku arvu kohta pildil, kus

z teljel oli rakkude hulk pildil. Sellised graafikud koostati iga süvendi kohta. Libiseva akna meetodil valiti resolutsiooniks 161,25 μm . Libiseva pildi akna suuruseks valiti 1974 μm *1458 μm (1224 * 904 pikslit), kuna see vastab reaalsele pildi suurusele, mida Cytation5 lubab mõõta. Nende andmete põhjal sai omakorda määrata, millise pildistamise asukoha korral ei hakkanud pildi kvaliteet ebaühtlase valgustuse tõttu veel langema. Selle hindamiseks kasutati raku diameetri suurust, kuna nähti, et kehvasti valgustatud rakke ei tundnud kasutatud algoritm väga hästi ära ning hindas nende diameetri madalamaks. Katse tulemusena määrati, et optimaalne vahekaugus pildi keskpaiga ja süvendi keskpaiga vahel on 2630 μm . Sellise kauguse korral on rakkude diameetrite erinevus nakatumata ja nakatunud süvendites hästi jälgitav. Kui piltide kaugus süvendi keskpaigast on suurem kui 2630 μm , näiteks 3500 μm , siis on rakkude tuvastamise kvaliteet kehvem, kauguse 500 μm puhul või veel lähemal on pildid üksteisele liiga lähedal, et piltidele jäänud rakud oleks esinduslikud. Antud parameeter on arvatavasti mikroskoobispetsiifiline ja ei pruugi olla ülekantav teistele mikroskoopidele. Samuti selgub, et kõik ühest süvendist tehtud pildid peaksid olema tehtud süvendi keskpaiga suhtes samalt kauguselt, kuna diameeter sõltub pildistamise asukohast.



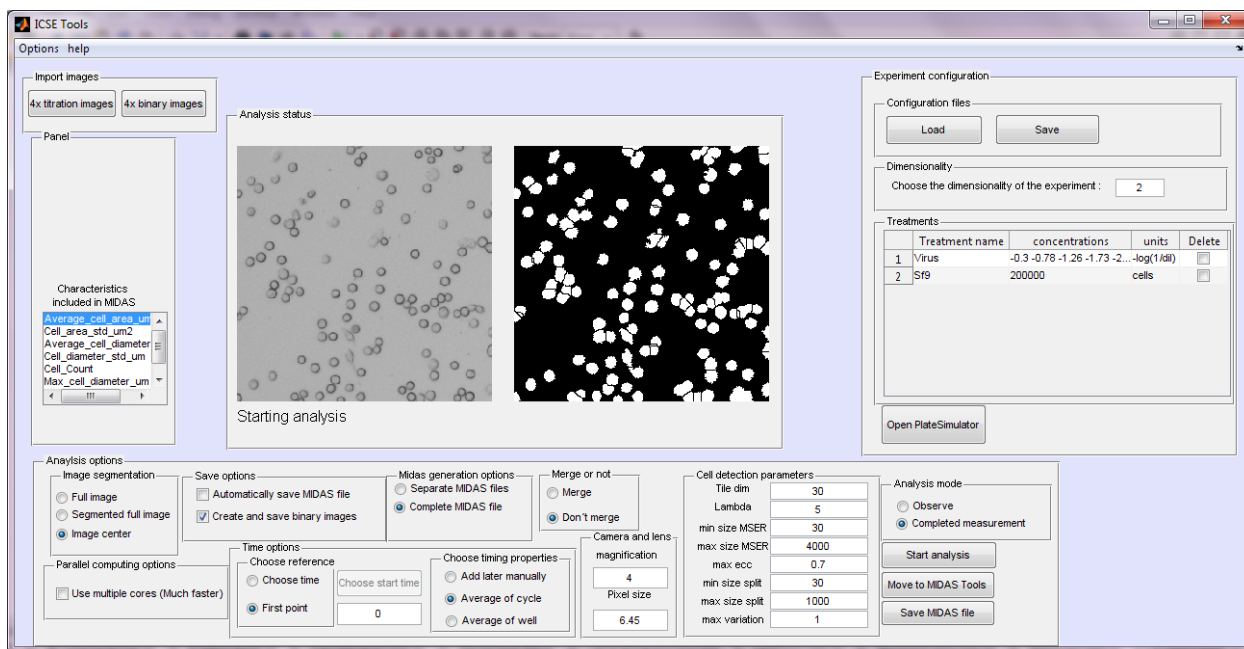
Joonis 2. Soojuskaardil (ingl. k. *heat map*) on näidatud, milline on süsteemi poolt tuvastatav keskmine rakkude diameeter sõltuvalt pildi tegemise asukohast. Joonisel on toodud näitlikustamiseks kaks punkti, mis vastavad optimeeritud pildi tegemise asukohale. On näha, et sellisel kaugusel süvendi keskpaigast ei ole diameetri väärtus hakanud veel oluliselt langema, mis tähendab, et piltide kvaliteet on hea.

Piltide arvu optimeerimine

Optimeerimise tulemusena saadi teada, et igast süvendist nelja pildi tegemine annab parima tulemuse. Piltide hulga suurendamine pikendab oluliselt katseks ja analüüsiks kuluvat aega, seega on vaja kasutada sellist piltide arvu, kus oleks piisavalt informatsiooni viiruse tiitri määramiseks. Ühe pildi kasutamisel nähti, et kohati ei ole igal pildil sõltuvalt süvendist sama hulk rakke või võib pilt olla kehva kvaliteediga. Sellisel juhul tuleks see süvend automaatselt lugeda mõõtmise mõttes ekseks ning informatsiooni selle süvendi kohta ei saakski. Sarnased probleemid esinevad ka kahe pildi kasutamisel. Kolme pildi tegemine oli tehniliselt keeruline ning seetõttu seda ei proovitud. Järgmisena prooviti kasutada nelja pilti süvendi kohta. Sellisel juhul jäaks neljale pildile kokku 8000 – 16000 rakkude, mis ligilähedaselt vastab CPCSE meetodil mõõdetavale rakkude arvule. Sellise piltide arvuga saavutati tiitri määramiseks rahuldava kvaliteediga tulemused. Analüüsiks kulunud aeg neljatuimalise arvutiga jäi sellisel juhul 10 minuti piiresse. Kui sellele lisada 7 minutit, mis kulub piltide tegemiseks, siis kokkuvõttes kulub ühe mõõtmise teostamiseks ~17 minutit. Samuti ei põhjustaks ühe pildi kehva kvaliteet terve süvendi kohta info kadumist. Piltide hulga edasine suurendamine tulemuste kvaliteeti oluliselt ei parandanud ning suurendas ainult analüüsiks kuluvat aega. Arvestades, et CPCSE meetodil kulub ühe plaadi mõõtmiseks ligikaudu 25 minutit, siis juba kuue pildi kasutamisel kuluks analüüsiks ligikaudu 25,5 minutit ehk rohkem kui CPCSE meetodil. Seega loeti optimaalseks piltide arvuks ühest süvendist neli, kuna selle puhul on tulemuste kvaliteet rahuldav ja mõõtmiseks kulunud aeg lühike.

Pilditöötlusprogrammi üldine tööpõhimõte

Pilditöötlusalgoritm põhineb eelnevalt kirjeldatud MSER algoritmi (Buggenthin *et al.* 2013) arendusel Sf9 rakkude äratundmiseks läbivas valguses tehtud mikroskoopiapildilt. Algoritmi on antud töö käigus on vähesel määral modifitseeritud ning liidetud tööriista ICSE Tools koosseisu. Pilditöötlustööriist ICSE Tools kuulub programmi Aparecium tööriistade hulka. Joonisel 3 on näidatud ICSE Toolsi graafilist kasutajaliidest piltide töötlemise käigus.



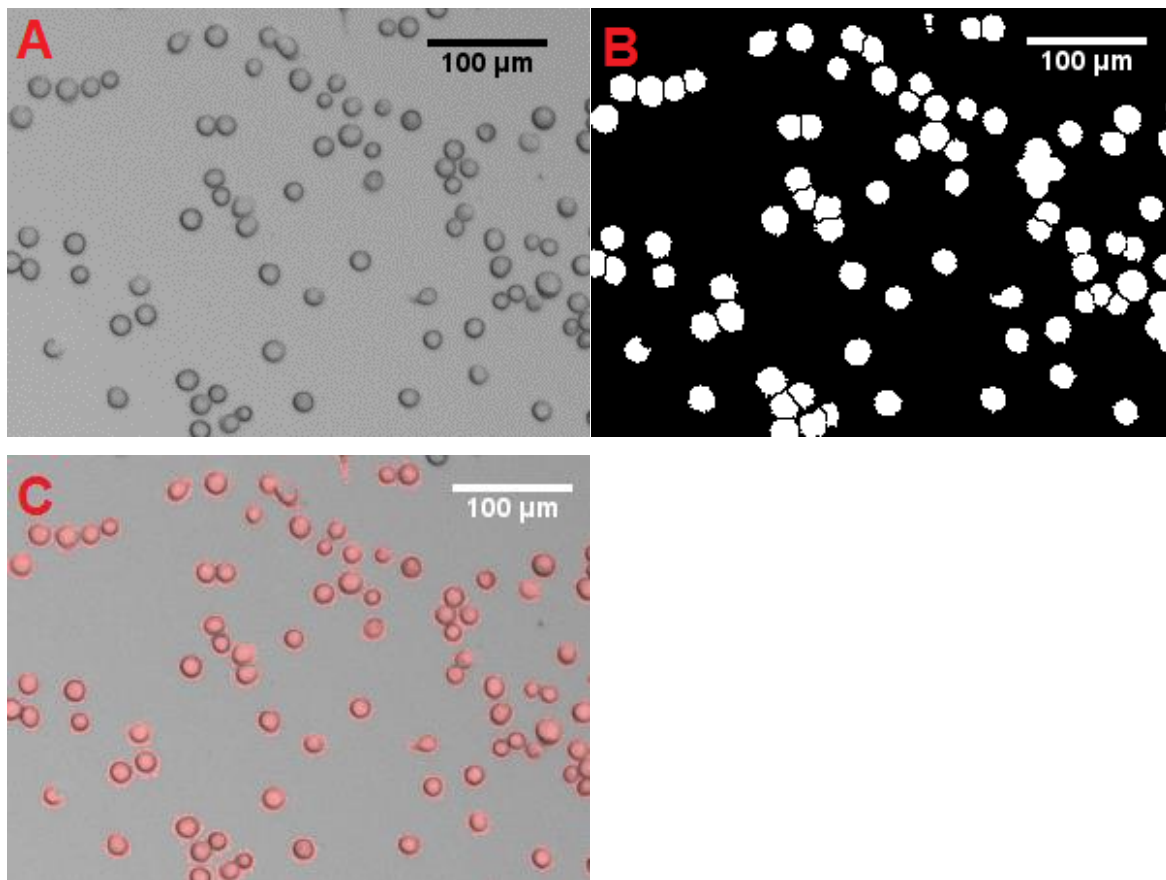
Joonis 3. Joonisel on ICSE Tools tööriista graafiline kasutajaliides

Piltide analüüsi esimese etapina laetakse pildid sisse mõnelt andmekandjalt, näiteks mälu pulgalt, kõvakettalt või serverist. Seejärel on kasutajal võimalus muuta piltide töötlemise ja salvestamise ning andmete esitamisega seotud parameetreid. Järgmise etapina genereeritakse pildi põhjal binaarpilt, kus 1-ga on tähistatud pikslid, mis kuuluvad pildil olnud raku koosseisu ning 0-ga pikslid, mis ei kuulu raku koosseisu ehk on osad taustast. Rakupilt ja selle põhjal arvutatud binaarpilt on kujutatud joonisel 4. Saadud binaarpildilt loetakse kokku rakkude summaarne hulk ühel pildil, iga raku pindala ning raku ekstsentrilisus. Seejärel lähendatakse rakkude pealtvaade ringile ning leitakse iga raku diameeter vastavalt valemile

$$d = \sqrt{\frac{4S}{\pi}} \quad (7)$$

kus d on ühe raku diameeter ja S on ühe raku pindala pealtvaates.

Lisaks diameetrile võimaldab programm arvutada rakkude keskmist pindala, rakkude diameetri standardhälvet, rakkude pindala standardhälvet ning keskmist rakkude maksimaalset diameetrit. Saadud andmed saab salvestada MIDAS (*ingl. k. Minimum Information for Data Analysis in Systems Biology*) formaadis, mis ühildub .xls, .xlsx ning .csv formaatidega.



Joonis 4. Pildil A on kujutatud 4x objektiiviga pildistatud Sf9 rakke. Pilt B on binaarpilt, mis on saadud pildi A töötlemisel eelnevalt kirjeldatud algoritmiga. Mustad pikslid on tuvastatud taustana ja valged pikslid on tuvastatud objektina, antud juhul rakuna. Pildil C on pildid A ja B kokku pandud ja tuvastatud rakkudele kuuluvatele pikslitele on antud punakas varjund.

Pilditöötlusalgoritmi modifitseerimine ning kvaliteediparameetrite hindamine

Kuna kasutusele võetud MSER algoritm ei olnud originaalis kiirust silmas pidades optimeeritud, siis töö käigus teostati osaline optimeerimine funktsioonile „splitCells.m“, kus on tehtud muudatused ka ära toodud. Selle tulemusel kasvas piltide töötlemise kiirus võrreldes esialgse algoritmiga $3,1 \pm 0,6$ korda. Lisaks adapteeriti funktsioon „ImageAnalyzer.m“ nii, et mitmetuumalise protsessori olemasolu korral on võimalik piltide analüüsi läbi viia paralleelselt kõigi tuumade peal. Tuumade arvu kahekordistamine vähendas ka analüüsiks kulunud aega kaks korda. Seega neljatuumalisel arvutil kulus pärast muudatuste tegemist sama hulga piltide töötlemiseks ligikaudu 12 korda vähem aega kui originaalalgoritmi kasutades.

Et kontrollida, kas algoritm töötab piisavalt täpselt, loendati kahelt pildilt rakud kokku ka käsitsi ning võrreldi rakkude keskmise diameetri väärtusi algoritmi poolt arvutatuga. Leiti, et diameetri tuvastamise suhteline viga on -5,8%, mis on rahuldav tulemus.

ICSE Meetodi valideerimine

ICSE meetodi valideerimiseks mõõdeti kokku viie erineva viiruse (Tabel 2) tiitrid kolmel erineval meetodil: ICSE meetodil, varem rutiinkasutuses olnud CPCSE meetodil, mida ka varem erinevate meetoditega võrreldud (Allikalt 2012), ning viiruslaigu meetodil. Viiruse kontsentratsioonid igal meetodil leiti kolme eri päeval teostatud korduskatse tulemuste keskmisena. ICSE ja CPCSE meetodi puhul jälgiti, et mõõtmise teostataks 24 tundi pärast rakkude viirusega nakatamist. Viiruslaigu meetodil loendati viiruslaigud siis, kui need olid silmaga nähtavad, kuid mitte veel omavahel kokku kasvanud, tavaliselt 6 – 10 päeva pärast nakatamist. Kuna viiruslaigu meetod annab tiitri ühikutes pfu/ml ning teised kaks meetodit ühikutes ivp/ml, siis pfu/ml ümberarvutuseks ühikusse ivp/ml kasutati võrrandit (O'Reilly *et al.* 1994)

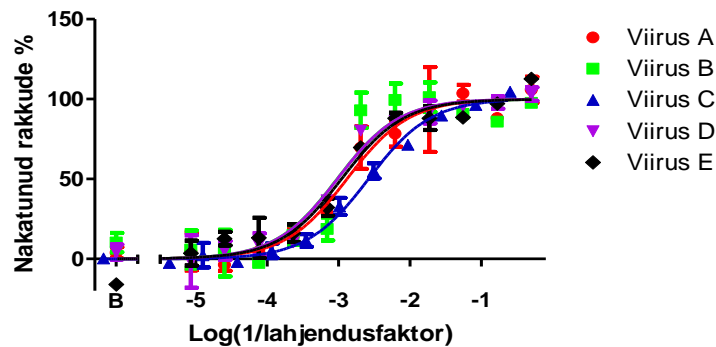
$$\text{ivp} = \frac{\text{pfu}}{\ln 0,5} = 1,44 * \text{pfu} \quad (8)$$

Tabel 2. Tabelis on näidatud, millised on erinevate viiruste A-E geneetilised eripärad

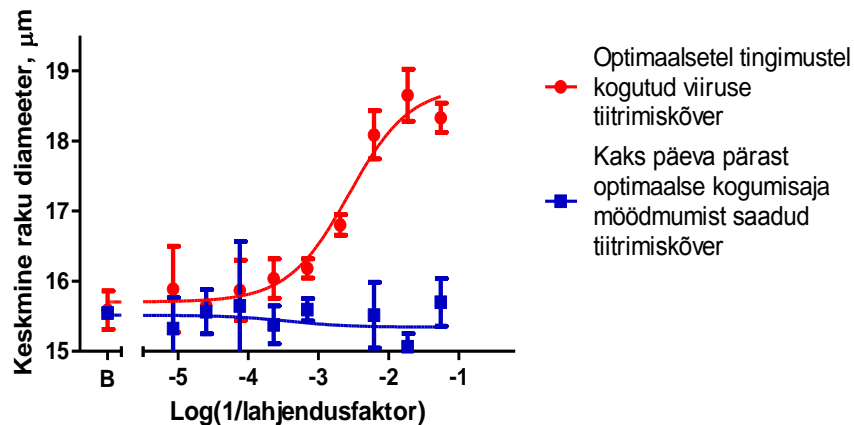
Viirus	Viiruse eripära
A	D ₁ R kodeeriva geeniga bakuloviirus
B	Epac-S ^{H74} biosensorit kodeeriva geeniga bakuloviirus
C	Epac-S ^{H134} biosensorit kodeeriva geeniga bakuloviirus
D	Epac-S ^{H188} biosensorit kodeeriva geeniga bakuloviirus
E	MC ₄ R kodeeriva geeniga bakuloviirus

Viiruste tiitrimisel ICSE meetodil saadud normaliseeritud graafikud on kujutatud joonisel 5. Kõikide viiruste tootmine on hästi õnnestunud, mida näitab võrdlemisi kõrge tiitri väärtus (vt Tabel 3). Negatiivse kontrollina on mõõdetud ka sellist viiruseproovi, mis koguti kaks päeva pärast optimaalset kogumise aega. Oodatavalt on sellisel juhul viiruse kontsentratsioon väga madal, kuna

rakkude suremisel lahusesse vabanevad proteaasid inaktiveerivad viiruse. Joonisel 6 kujutatud katses on optimaalsetel tingimustel kogutud viiruse kontsentratsioon $7,4 \cdot 10^7 \pm 1,3 \cdot 10^7$ ivp/ml, mitteoptimaalsetel tingimustel kogutud viiruse kontsentratsioon jääb allapoole meetodi avastamispiiri.



Joonis 5. Joonisel on toodud normaliseeritud esinduslikud tiitrimisgraafikud iga tiitritud viiruse kohta. Et viirused oleksid võrreldavad on y-telje normaliseerimiseks on kasutatud võrrandit 1, kus $\hat{\mu}_1$ lähenduseks on võetud mudeli 1 parameeter D_{\max} ja $\hat{\mu}_0$ lähenduseks mudeli 1 parameeter D_0 . Iga graafik on saadud ühe katse tulemusel ning regressioonanalüüsis on kasutatud mudelit 1. $n=3$.



Joonis 6. Joonisel on kujutatud sama tüüpi viiruse tiitrimisel saadavad graafikud ICSE meetodil, kui viirus toodeti optimaalsetel ja mitteoptimaalsetel tingimustel. Tiitri määramiseks on kasutatud mudelit 1.

Tabel 3. Tabelis on toodud viie erineva viiruse A-E tiitrimise tulemused kolmel erineval meetodil. ICSE ja CPCSE meetodi puhul on tulemuse leidmiseks kasutatud kahte erinevat regressioonimudelit, mudelit 1 ja mudelit 2.

Viirus	Log[(ivp/ml)*ml] ICSE meetodil, mudel 1	Log[(ivp/ml)*ml] ICSE meetodil, mudel 2	Log[(ivp/ml)*ml] CPCSE meetodil, mudel 1	Log[(ivp/ml)*ml] CPCSE meetodil, mudel 2	Log[(ivp/ml)*ml] Viiruslaigu meetodil
A	8,21±0,02	8,18±0,02	8,19±0,02	8,41±0,03	7,7±0,2 [†]
B	8,30±0,02	8,43±0,03	8,1±0,4	8,2±0,4	7,5±0,2 ^{*,§§,‡}
C	8,1±0,2	8,2±0,2	7,95±0,06	8,15±0,07	7,6±0,2
D	8,4±0,3	8,5±0,3	7,9±0,16	8,10±0,15	7,45±0,13 ^{*,§§§}
E	8,22±0,04	8,42±0,03	8,01±0,03	8,24±0,05	7,92±0,02

* tähistab statistiliselt olulist erinevust ICSE mudel 1 ja viiruslaigu meetodi vahel (p < 0,05)

** tähistab statistiliselt olulist erinevust ICSE mudel 1 ja viiruslaigu meetodi vahel (p < 0,01)

§§ tähistab statistiliselt olulist erinevust ICSE mudel 2 ja viiruslaigu meetodi vahel (p < 0,01)

§§§ tähistab statistiliselt olulist erinevust ICSE mudel 2 ja viiruslaigu meetodi vahel (p < 0,001)

‡ tähistab statistiliselt olulist erinevust CPCSE mudel 2 ja viiruslaigumeetodi vahel (p<0,05)

Tabelisse 3 on koondatud kõigi kolme meetodiga leitud viiruste kontsentratsioonid. ICSE ja CPCSE meetodil mõõdetud tulemustest kontsentratsiooni arvutamiseks on kasutatud nii mudelit 1 kui ka mudelit 2. Selgub, et ICSE ja CPCSE meetodite vahel statistilist erinevust ei ole olenemata sellest, millist mudelit kasutati. Statistiline erinevus esines vaid mõningate viiruslaigu meetodil saadud tulemuste ja teistel meetoditel saadud tulemuste vahel. Statistilist erinevust hinnati dispersioonianalüüsiga.

Raku diameetri suurenemiste võrdlus ICSE meetodi ja CPCSE meetodi vahel

Iga valideerimiskatse puhul määrati ka kui suur oli erinevus nakatunud rakkude keskmise diameetri ja nakatumata rakkude keskmise diameetri vahel. Nende kahe parameetri hinnanguks võeti mudel 1 ülemise ja alumise platoo ehk D_{\max} ja D_0 hinnangud. Mudeli 2 parameetrid D_{\max} ja D_0 ei erinenud oluliselt mudel 1 poolt ennustatavatest vastavate parameetri väärtustest. Rakkude suhteline suurenemine arvutati valemiga

$$\Delta D = \frac{D_{max} - D_0}{D_0} * 100\% \quad (9)$$

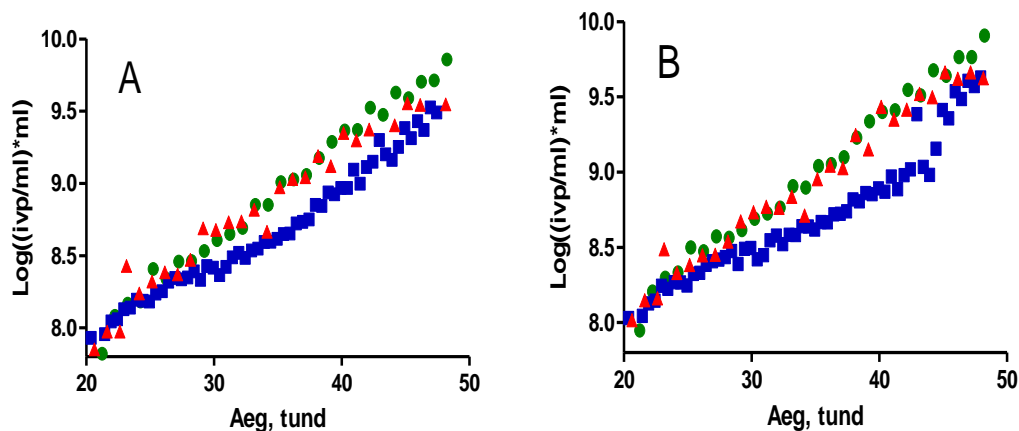
Tabel 4. Viiruste A-E tiitrimisel mõõdetud ΔD väärtused ICSE ja CPCSE meetodil kasutades mudelit 1

Viirus	ΔD CPCSE meetodil	ΔD ICSE meetodil
A	11,0 \pm 1,6%	20 \pm 4%
B	12,1 \pm 1,6%	19 \pm 2%
C	12 \pm 3%	17,2 \pm 1,6%
D	13,5 \pm 0,3%	21,1 \pm 0,8%
E	11,4 \pm 1,1%	19 \pm 5%

Mõõdetavate parameetrite muutumine ajas

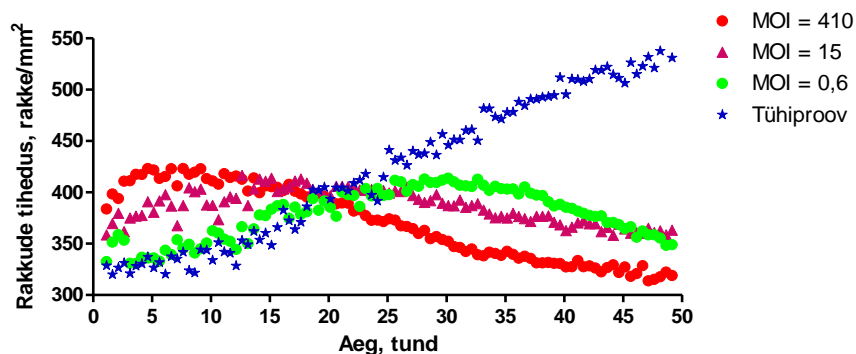
Antud katsesüsteemi kasutades oli võimalik jälgida, kuidas mõõdetavad parameetrid ajas muutuvad ning kuidas nende muutumine sõltub viiruse kontsentratsioonist. Jälgida on võimalik rakuarvu muutust, rakkude keskmise diameetri muutust, rakkude keskmise pindala muutust ning rakkude diameetri ja pindala standardhälbeid, aga ka mudelite poolt ennustatava viiruse tiitri muutust ajas. Kuigi selliste muutuste jälgimise võimalus antud katsesüsteemi ja tarkvaraga tõestab, et mõõtmine ja andmete analüüs on tõepoolest lihtne, ei ole antud töö eesmärgiks tervikliku nakatumismudeli väljatöötamine, kuigi ei ole välistatud, et antud mõõteandmete põhjal oleks võimalik selline mudel ka koostada.

Joonisel 7 on toodud nii mudeli 1 kui ka mudeli 2 poolt ennustatav viiruse kontsentratsioon erinevatel ajahetkedel. Selgub, et mõlema mudeli poolt ennustatavad viiruse kontsentratsioonid samal ajahetkel on omavahel sarnased. Korduskatsed langevad ajavahemikus 20 – 30 tundi pärast nakatumist hästi kokku ning viiruse kontsentratsiooni logaritmi sõltuvust ajast võib küllaltki pikas ajavahemikus empiiriliselts kirjeldada lineaarfunktsiooniga.



Joonis 7. Graafikul A on näidatud viiruse A kolmest korduskatsesest määratav $\log[(ivp/ml)*ml]$ sõltuvus ajast kasutades mudelit 1. Graafikul B on samadest andmetest leitud $\log[(ivp/ml)*ml]$ kasutades mudelit 2.

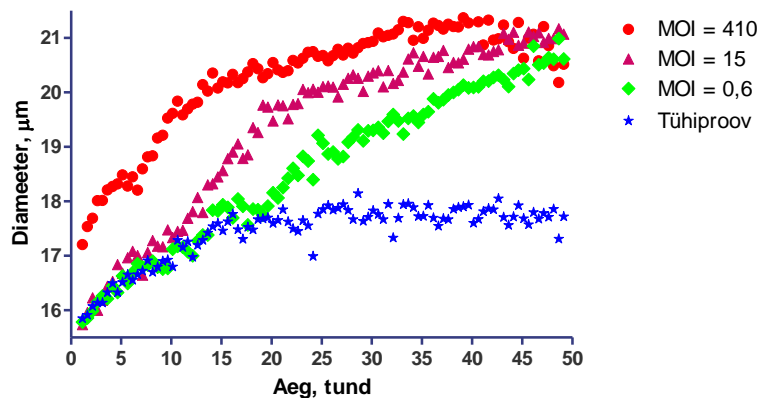
Joonisel 8 on näidatud, kuidas rakkude tihedus sõltub ajast erineva MOI korral. Graafikud on saadud Viiruse E tiitrimisel. On näha, et tühiproovis jätkavad rakud kasvamist, samas kui viirusega nakatumisel hakkavad rakud surema. Selgub, et mida suurem on MOI, seda kiiremini rakkude arv väheneb. Ilmselt on selle põhjuseks rakkude suremine nakkuse toimel.



Joonis 8. Graafikul on näidatud viiruse E näitel rakkude tiheduse sõltuvust ajast erinevate MOI väärtuste korral. Viiruse E jaoks $n=3$, kõigi viiruste peale kokku $n=17$.

Joonisel 9 on näidatud, kuidas rakkude aritmeetiline keskmine diameeter muutub ajast erinevate MOI väärtuste korral. On näha, et kõige suurema MOI juures on rakkude diameetri suurenemine kõige kiirem. Samuti on näha, et tühiproovis toimub ajas samuti rakkude diameetri suurenemine kuni 15 tunnini pärast nakatamist ehk 15,5 tunnini pärast rakkude plaadile viimist. Lisaks võib

tähele panna, et $MOI = 0,6$ juures ei erine rakkude diameeter tühiproovi diameetrist oluliselt, kuni nakatumisest on möödunud 20 tundi.



Joonis 9. Graafikul on näidatud viiruse E näitel keskmise rakudiameetri sõltuvust ajast erinevate MOI väärtuste korral. Viiruse E jaoks $n=3$, kõigi viiruste peale kokku $n=17$.

ICSE meetodi kvaliteediparameetrite määramine

Kuna ICSE meetodi mõõtmiste mudel ei ole lineaarfunktsioon, siis läheneti määramispiiri ja avastamispiiri hindamisele konservatiivselt. Eeldati, et proov on usaldusväärselt kvantifitseeritav siis, kui kõige kangema kontsentratsiooniga punkt ehk kahekordne lahjendus proovist saavutab normaliseeritud graafikul vähemalt 98% tegeliku ülemise platoo väärtusest ning proovi kuuekordne lahjendus proovist saavutab vähemalt 95% tegeliku ülemise platoo väärtusest. Sellistel tingimustel loeti mudel hästi defineerituks, kuna parameeter D_{max} on usaldusväärselt määratav. Sellistele tingimustele vastab väärtus viiruse tiitri väärtus $2,5 \cdot 10^7$ ivp/ml. Selline kontsentratsioon võeti nii määramispiiri kui ka avastamispiiri hinnanguks.

TULEMUSTE ARUTELU

Katsetest selgub, et hüpoteesi kohaselt on tõepoolest olemas efekt, et Sf9 rakuliini rakkude diameeter hakkab aja möödudes suurenema, kui rakke nakatada bakuloviirusega, nagu on näidatud ka varasemates töödes (Janakiraman *et al.* 2006, Palomares *et al.* 2001). Leitud seost on võimalik kirjeldada mitme mudeli abil. Mudel 1 on kolmeparameetriline logistiline funktsioon ning mudel 2 põhineb bakteriofaagi nakatumise mudelil (Ellis and Delbrück 1939). Mudel 1 põhineb eeldusel, et iga rakk võib nakatuda maksimaalselt ühe viirusosakesega, mille tulemusel muutub raku diameeter 24 tunni jooksul suuremaks. Mudel 2, mis eeldab samuti, et diameeter muutub 24 tunni jooksul suuremaks, võtab arvesse seda, et üks rakk võib nakatuda ka mitme viirusosakesega. Sisuliselt oleks õigem kasutada mudelit 2, kuna selle teoreetiline tagapõhi on tugevam. Seda tõestavad mitmed katsed, kus rakuliini on nakatatud mitme erineva bakuloviirusega ning tulemuseks on saadud rakud, mis ekspresseerivad geene mitmest viirustest (Urabe *et al.* 2002, Kost *et al.* 2005). Et kontrollida kumb kahest mudelist sobib paremini kirjeldama katsest saadud andmeid võrreldi neid mudeleid omavehel kasutades Akaike informatsioonikriteeriumit. Selgus, et mõlemad mudelid kirjeldavad katseandmeid võrdselt hästi ning kuna mõlemat mudelit kirjeldavad kolmeparameetrilised võrrandid, siis ei ole võimalik valida ka lihtsamat võrrandit. Seega võib järeldada, et mõlemad mudelid sobivad katseandmeid kirjeldama võrdselt hästi.

Antud andmetest saab määrata, et 24 tundi pärast nakatumist on nakatunud rakkude keskmine diameeter ICSE meetodil $19,3 \pm 1,4\%$ suurem kui nakatumata rakkude diameeter, mis ei ole väga heas kooskõlas CPCSE meetodi poolt antavate tulemustega: $12,1 \pm 1,0\%$ suurenemine 24 tundi pärast nakatumist, kuid on heas kooskõlas eelnevalt tehtud töödega, kus leiti kasvuks olevat 20 – 45% (Janakiraman *et al.* 2006, Palomares *et al.* 2001, Gotoh *et al.* 2008). Erinevuse võib põhjustada erinev mõõtemetoodika. Nii ICSE meetodil kui ka varasemates rakudiameetrite mõõtmises on kasutatud mikroskoopiat ja seega lähtutud diameetri arvutamisel vaadeldavast raku pindalast. CPCSE meetodi puhul lähtutakse diameetri arvutamisel aga raku ruumalast. ICSE meetodi valideerimiseks kasutati viit erinevate geneetiliste modifikatsioonidega bakuloviirust. Viirused B, C ja D sisaldasid vastavalt geneetiliste modifikatsioonidena biosensorite Epac-S^{H74}, Epac-S^{H134} ja Epac-S^{H188} kodeerivaid geene ning viirused A ja E sisaldasid vastavalt D₁ retseptorit ja MC₄ retseptorit kodeerivaid geenijärjestusi. Viirused erinevad selle poolest, et viiruste B, C ja D puhul ei ekspresseeru Sf9 rakkudes ühtegi lisageeni võrreldes modifitseerimata viirusega, kuna

modifitseeritud geenijärjestused on viiruse genoomis sellise promootori järel, mida Sf9 rakud ei kasuta. Neid kolme viirust kasutatakse BacMam tehnoloogias. Viiruste A ja E puhul on aga viiruse genoomis tehtud modifikatsioonid sellise promootori järel, mis indutseerib Sf9 rakkudes vastavat retseptorit kodeeriva geeni ekspressiooni, mis omakorda tähendab, et nakatunud rakk toodab lisaks veel ka suures koguses võõrvalku. Selgub, et selline põhimõtteline erinevus viiruste vahel ei mõjuta ICSE meetodil saadavate tiitrimiste tulemuste kvaliteeti võrreldes CPCSE ja viiruslaigu meetodil mõõdetavate tulemustega oluliselt. Kuna mõne katse puhul on statistiline erinevus viiruslaigumeetodi ja teiste meetodite vahel siiski olemas, siis on soovitatav kasutada ühe konkreetse BEVS või BacMam rakenduse jaoks läbivalt ühte kindlat meetodit.

Katsetest selgus, et rakkude diameeter sõltub tugevasti sellest, kui palju oli aega möödunud nakatamise algusest, leitud sõltuvus ei olnud lineaarne. Kuna konkreetse mehhanismi uurimine ei olnud antud töö eesmärk, siis saab öelda vaid, et diameeter kasvab aja möödudes ja selle kasvu kiirus sõltub MOI väärtusest uuritavas süvendis. Andmetest selgub, et diameeter kasvab ka nakatamata rakkudes. Selle efekti seletamiseks võib välja pakkuda kaks hüpoteesi. Esimese variandina võib toimuda raku kuju muutus, mis on tingitud sellest, et rakud, mis enne kasvasid suspensioonina, kasvavad nüüd rakuplaadi pinnal ja omandavad seega vähem sfäärilise kuju ja vajuvad laiali, mis viiks näilise diameetri kasvuni. Teise variandina on võimalik, et ajas muutub hoopis rakkude kontrastsus tausta suhtes suuremaks, ning seega tuvastab algoritm rakud mõõtmise alguses väiksemana, kui nad tegelikkuses on.

Kuna vastavaid eelnevalt väljatoodud nakatumise mudeleid on matemaatiliselt võimalik kasutada ka teistel ajahetkedel mõõdetud andmete korral, siis on võimalik kujutada graafiliselt ka aeg vs $\log(\text{ivp})$ sõltuvust. Kuna antud sõltuvus on empiiriliselt kirjeldatav lineaarfunktsiooniga, siis ei ole välistatud, et sellise sõltuvuste abil oleks võimalik leida ka ühe bakuloviiruse või bakuloviiruste tüübi jaoks kindel graafiku tõusu väärtus ning leida viiruse kontsentratsioon ka siis, kui mõõtmine on teostatud mõnel muul ajahetkel kui 24 tundi pärast esialgset nakatumist. Selliste tegurite määramine konkreetse viiruse jaoks on lihtne, tavalise tiitrimismõõtmise asemel tuleks lihtsalt uue viirusetüübi puhul määrata kineetilise mõõtmise andmete põhjal ära graafiku tõusu väärtus ning mõnel teisel ajahetkel arvutatud näilise tiitri põhjal regressiooni abil leida tõeline viiruse tiiter.

Rakudiameetri ja -arvu kvantifitseerimiseks kasutatud algoritm toimis väga hästi ning kvaliteet on samal tasemel, mida oli kirjeldatud originaalartiklis (Buggenthin *et al.* 2013). Antud algoritmi kasutav isetehtud programm Aparecium on kasutajasõbralik ning vabavaraliselt saadaval. Samuti pakub Aparecium häid võimalusi andmete kiireks interpreteerimiseks ning katse kirjeldamiseks ja tulemuste salvestamiseks. Katsed on tänu Apareciumile lihtsasti analüüsitavad regressioonitarkvaradega nagu Graphpad Prism, SBToolbox2 ja Matlab. Andmeid on lihtne säilitada ja süstematiseerida, lisaks saab mikroskoopia meetodil saadud pilte vajadusel uuesti analüüsida, kui töötatakse välja paremad algoritmid. See on suur eelis võrreldes kõigi teiste viiruste kvantifitseerimise meetoditega, kus puudub võimalus vanu andmeid uuesti töödelda paremate meetoditega, kui selleks peaks vajadus tekkima.

Kokkuvõte

Bakuloviiruse kontsentratsiooni määramine on oluline nii BacMam ekspressioonisüsteemi korralikuks toimimiseks kui ka valkude tootmiseks BEVS tehnoloogias. Bakuloviiruste tiitri määramiseks on ka varem välja pakutud mitu meetodit, kuid neil kõigil on omad miinused.

Käesoleva töö eesmärgiks olnud bakuloviiruste automatiseeritud kvantifitseerimismeetodi väljatöötamine ja valideerimine ning meetodi jaoks vajaliku graafilise kasutajaliidesega pilditöötlusprogrammi loomine õnnestus. Töös arendatud ICSE ehk pildianalüüsil põhinev raku suuruse hindamise meetod on kvaliteetne, hästi automatiseeritud ning võrreldes teiste meetoditega on tal mitu eelist, näiteks nõuab teostajalt väiksemat kogemust ning käsitsi tööd kui teised meetodid. Meetod valideeriti kasutades kolme erinevat meetodit ning kokku viit erinevat viirust, millest kaks olid BEVS süsteemis ning kolm BacMam süsteemis kasutatavad bakuloviirused. Loodi graafilise kasutajaliidesega ICSE Tools tööriist programmi Aparecium koosseisus, millega on andmete ja piltide analüüs kiire ja lihtne.

Kasutatud algoritm ja programm on saadaval vabavarana lingil <http://www.ut.ee/gpcr/Aparecium/> ning töö tulemuste põhjal on valmimas teadusartikkel. Töö käigus analüüsiti kokku ligikaudu 140 000 pilti ning loendati ja mõõdeti 280 000 000 Sf9 raku. Kokku teostati üle 47 katse. Nüüdseks on ICSE meetod TÜ Bioorgaanilise keemia õppetoolis rutiinkasutuses.

Summary

The determination of baculovirus concentration is important for both the quality of BacMam system and protein production using BEVS. Several methods have been proposed for baculovirus titration before but all of them have drawbacks.

The aim of this work was to develop an automated method for baculovirus quantification, to validate the method and to develop an image analysis programme with a graphical user interface all of which were achieved. Image-based cell size estimation shortly ICSE method developed in this work is of high-quality, automated and has several advantages compared to other methods. For example it requires less skill and time from the person performing the analysis. The method was validated using three different methods and five different baculoviruses two of which are meant for BEVS and three of which are meant to be used for BacMam system. An image analysis programme called ICSE Tools was created as a part of programme called Aparecium. Image and data analysis with ICSE Tools is fast and simple.

The used algorithm and programme are available as freeware at <http://www.ut.ee/gpcr/Aparecium/> and the results of this thesis will be published in a scientific paper. Over 140,000 images of Sf9 cells were made and over 280,000,000 cells were counted and measured. Over 47 experiments were performed. The method is now in routine use in the Chair of Bioorganic chemistry of University of Tartu.

KASUTATUD KIRJANDUS

Allikalt, A. (2012). Bakuloviiruste tiitrimismeetodite võrdlus.

Baer, A., & Kehn-Hall, K. (2014). Viral concentration determination through plaque assays: using traditional and novel overlay systems. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (93), e52065.

Boyce, F. M., & Bucher, N. L. (1996). Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(6), 2348-2352.

Buggenthin, F., Marr, C., Schwarzfischer, M., Hoppe, P. S., Hilsenbeck, O., Schroeder, T., & Theis, F. J. (2013). An automatic method for robust and fast cell detection in bright field images from high-throughput microscopy. *BMC bioinformatics*, 14(1), 297.

Cox, M. M. (2012). Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine*, 30(10), 1759-1766.

Ellis, E. L., & Delbrück, M. (1939). The growth of bacteriophage. *The Journal of General Physiology*, 22(3), 365-384.

Felberbaum, R. S. (2015). The baculovirus expression vector system: a commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnology journal*, 10(5), 702-714.

Gotoh, T., Fukuhara, M., & Kikuchi, K. I. (2008). Mathematical model for change in diameter distribution of baculovirus-infected Sf-9 insect cells. *Biochemical Engineering Journal*, 40(2), 379-386.

Hefferon, K. L., Oomens, A. G. P., Monsma, S. A., Finnerty, C. M., & Blissard, G. W. (1999). Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry. *Virology*, 258(2), 455-468.

Hitchman, R. B., Siaterli, E. A., Nixon, C. P., & King, L. A. (2007). Quantitative real-time PCR for rapid and accurate titration of recombinant baculovirus particles. *Biotechnology and bioengineering*, 96(4), 810-814.

Hurley, J. (1970). Sizing particles with a Coulter counter. *Biophysical journal*, 10(1), 74.

Janakiraman, V., Forrest, W. F., & Seshagiri, S. (2006). Estimation of baculovirus titer based on viable cell size. *Nature protocols*, 1(5), 2271-2276.

- Jarvis, D. L. (2009). Baculovirus–insect cell expression systems. *Methods in enzymology*, 463, 191-222.
- Klette, R. (2014). *Concise computer vision*. Springer, London.
- Kost, T. A., & Condreay, J. P. (2002). Innovations—Biotechnology: Baculovirus Vectors as Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells: Biosafety Considerations. *Applied Biosafety*, 7(3), 167-169.
- Kost, T. A., Condreay, J. P., & Jarvis, D. L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature biotechnology*, 23(5), 567-575.
- Kost, T. A., Patrick Condreay, J., & S Ames, R. (2010). Baculovirus gene delivery: a flexible assay development tool. *Current gene therapy*, 10(3), 168-173.
- Kost, T. A., & Kemp, C. W. (2016). Fundamentals of Baculovirus Expression and Applications. In *Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization* (pp. 187-197). Springer International Publishing.
- Meade, H. M. (1999). *Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression*. Ed. by Fernández JM, Hoeffler JM.
- Merten, O. W., Perrin, P., & Griffiths, B. (1998). New developments and new applications in animal cell technology (Vol. 15). Springer Science & Business Media.
- Oberlin, A. (1989). High-resolution TEM studies of carbonization and graphitization. *Chemistry and physics of carbon*, 22(1).
- O'Reilly, D. R., Miller, L. K., & Luckow, V. A. (1994). Baculovirus expression vectors: a laboratory manual (pp. 134). Oxford University Press on Demand.
- Palomares, L. A., Pedroza, J. C., & Ramírez, O. T. (2001). Cell size as a tool to predict the production of recombinant protein by the insect-cell baculovirus expression system. *Biotechnology letters*, 23(5), 359-364.
- Summers, M. D., & Smith, G. E. (1987). *A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures*.

Tscherepanow, M., Zöllner, F., Hillebrand, M., & Kummert, F. (2008). Automatic segmentation of unstained living cells in bright-field microscope images. In *Advances in Mass Data Analysis of Images and Signals in Medicine, Biotechnology, Chemistry and Food Industry* (pp. 158-172). Springer Berlin Heidelberg.

Urabe, M., Ding, C., & Kotin, R. M. (2002). Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Human gene therapy*, 13(16), 1935-1943.

Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J., & McCawley, P. (1977). The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In vitro*, 13(4), 213-217.

Wood, H. A., & Granados, R. R. (1991). Genetically engineered baculoviruses as agents for pest control. *Annual Reviews in Microbiology*, 45(1), 69-87.

Virocyt (2013). An overview of virus quantification techniques. Denver, Virocyt.com

Infoleht

Automatiseeritud meetodi arendamine bakuloviiruste kvantifitseerimiseks

Käesolevas bakalaureusetöös on välja töötatud meetod läbiva valguse mikroskoobi piltidelt rakkude suuruste mõõtmiseks ning selle abil bakuloviiruste tiitri määramiseks. Töös optimeeriti rakkude suuruse mõõtmiseks mikroskoobiga pildistamise parameetrid ja töötati välja automaatsed mõõtmisprotokollid. Samuti programmeeriti töörist ICSE (*ingl. k. Image-based cell size estimation*) Tools, mille abil on mikroskoobi piltide analüüs lihtne ja kiire ning loodi võimalus mõõtmistulemusi regressioonianalüüsiprogrammiga lihtsasti analüüsida. Töö tulemusena loodud bakuloviiruste tiitrimise meetod on kiirem, nõuab vähem manuaalset tööd ja kogemust kui varasemad meetodid. Uue meetodiga saadavad tulemused langevad hästi kokku varem kasutusel olnutega.

Development of an automated method for baculovirus quantification

In this bachelor's thesis a method has been proposed for determining baculovirus titers based on cell size measured from brightfield microscopy images. The imaging parameters were optimised for the microscope and automatic measurement protocols were created. Also a software tool called ICSE Tools was created, which allows easy and quick analysis of the cell sizes and also provides means for exporting data to regression analysis software packages. The proposed method is faster, requires less manual labor and experience compared to the previous methods. The measurements of this method are in good agreement with the methods developed before.

Märksõnad: Bakuloviirused, mikroskoopia, masinnägemine

Keywords: Baculoviruses, microscopy, computer vision

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, _____ Tõnis Laasfeld _____,

(autori nimi)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
AUTOMATISEERITUD MEETODI ARENDAMINE
BAKULOVIIIRUSTE KVANTIFITSEERIMISEKS,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on _____ Sergei Kopantšuk, PhD _____,

(juhendaja nimi)

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.06.2019** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **26.05.2016**